

Eine Modifikation der Versilberungstechnik am
Semidünnschnitt nach MOVAT und deren Anwendung
in der Zytomorphologie

vorgelegt von
Renate Völkers

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554425_0112

Aus dem Pathologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. H. B r e d t

Eine Modifikation der Versilberungstechnik am
Semidünnschnitt nach MOVAT und deren Anwendung
in der Zytomorphologie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg - Universität Mainz

vorgelegt von
Renate Völkers
aus Naumburg

Mainz 1970

Dekan: Prof. Dr. Dr. W. Ketterl

Referent: Prof. Dr. R. Bässler

Korreferent: Prof. Dr. H. Bredt

Tag der
mündlichen Prüfung: 23. 11. 1971



gesamtherstellung
ditters bureodienst
mainz



Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. TECHNISCHE VORAUSSETZUNGEN FÜR DIE ULTRADÜNN- SCHNITT-METHODEN	2
1. a. Entwicklung neuer Fixationsmittel	2
b. Entwicklung neuer Einbettungsmittel	3
c. Entwicklung neuer Mikrotome und Messer	5
2. Der Semidünnschnitt. Entstehung und Anwendung	6
III. FÄRBETECHNIKEN ANGEWANDT AM SEMIDÜNNSCHNITT	8
Tabellarische Übersicht der Färbungen am Semidünnschnitt mit verschiedenen Einbettungsmitteln	8
1. Methacrylat	10
2. Araldit	12
3. Maraglas	14
4. Epon	15
5. Vestopal	19
6. Celloidin-Paraffin	21

IV. EIGENE VERSUCHE	23
1. Anwendung einiger Färbetechniken	23
2. Modifikation der Versilberung nach MOVAT	25
3. Färberische Voraussetzungen durch Kaliumpermanganat	28
4. Färbevorgang	29
5. Anmerkungen zur Färbetechnik	32
V. BEISPIELE FÜR DIE ANWENDUNG DIESER VERFAHREN IN DER ZYTMORPHOLOGIE	36
VI. DISKUSSION	43
VII. ZUSAMMENFASSUNG	45
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	46
IX. LEBENSLAUF	62

EINLEITUNG

Seitdem die Elektronenmikroskopie ein Instrument im Dienst der Zell- und Gewebeforschung wurde, bemühte man sich, die neugefundenen Strukturen und Ordnungen mit den bekannten zu vergleichen. Da der Sprung vom normalen lichtmikroskopischen Schnitt zum Ultradünnschnitt des Elektronenmikroskops kein kontinuierlicher Vorgang war, sondern ein abrupter Übergang zu neuen Dimensionen, mußte man bemüht sein, eine Brücke zwischen beiden Extremen zu finden. Eine Verbindung und Vergleichsmöglichkeit ergab sich durch Gewebeschnitte, die, wie die Parenchyme für die Elektronenmikroskopie behandelt, unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Modifikation der Versilberung nach MOVAL vorgestellt, die zur genauen Darstellung der Kerne und Feinstrukturen der Zelle erarbeitet wurde.

Anwendung fand sie am Semidünnschnitt, der durch ihre Wirkung eine vollausnutzbare Vergleichsmöglichkeit zwischen Licht- und Elektronenmikroskop bildet.

TECHNISCHE VORAUSSETZUNGEN FÜR DIE ULTRADÜNN-

CHENIE-METHODEN

Heute stehen die verschiedenen lichtmikroskopischen Untersuchungsmethoden und die Elektronenmikroskopie zur Verfügung, um Gewebe beobachten, erkennen, beurteilen und einordnen zu können. Die lichtmikroskopische Auflösung liegt mit $0,2 \mu$ weit unter der des Elektronenmikroskops von $6-8 \text{ \AA}$. Die lichtmikroskopischen Verfahren brauchen eine durchschnittliche Schnittdicke von $3 - 10 \mu$, hierbei wird aber der volle Auflösungsbereich nicht ausgenutzt, man benötigt dazu viel dünnere Schnitte. Da ein gutes Mikrotom für die normale Histologie nur bis zu 2μ dünne Schnitte herstellen kann, mußte man nach neuen Wegen suchen, die über die Möglichkeiten der klassischen Histologie hinausgehen.

Bei der Entwicklung und Forschung nach ultradünnen, durchstrahlbaren Gewebeschnitten von weniger als $1000 \text{ \AA}$ Dicke, die die Voraussetzung für das Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskops sind, stellte sich heraus, daß die $0,3 - 2 \mu$ dicken Schnitte, sozusagen ein Abfallprodukt der elektronenmikroskopischen Präparation, alle Anforderungen erfüllten, die erlaubten, die Leistungen des Lichtmikroskops voll in Anspruch zu nehmen.

Entwicklung neuer Fixationsmittel

Die Dünne der Schnitte forderte für die Behandlung und Aufbereitung der Gewebe andere Kriterien als die herkömmlichen Methoden. Man suchte brauchbare neue Substanzen sowohl auf

dem Gebiet der Fixation, als auch bei den Einbettungsmitteln und den Mikrotomen.

PALADE (86) stellte 1952 als neues Fixationsmittel ein gepuffertes OsO_4 -Gemisch vor.

RHODIN (96) und PALADE (87) variierten den pH-Wert dieser Fixierflüssigkeit, andere veränderten die chemische Zusammensetzung der Puffer; so beschrieb MULLONG (70) einen Phosphatpuffer, BENNET und LUFT (8) einen s-Collidinpuffer, während WOOD und LUFT (130) einen Arsenatpuffer benutzten.

Als Drittes ließ sich die osmotische Konzentration der Lösung verändern (RHODIN (96) und ZETTERQVIST (131)).

Kaliumpermanganat wurde 1956 von LUFT (64) als neue Fixationslösung eingeführt.

Mit mehr oder weniger Erfolg wurde von FARRAH und LODGE (21) und von PEASE (90) die Aldehydfixation angewandt.

Am gebräuchlichsten jedoch blieb nach wie vor die Osmiumtetroxydlösung oder eine Kombinationsfixation aus OsO_4 und einem Aldehyd z.B. Glutaraldehyd.

Entwicklung neuer Einbettungsmittel

Die übliche Einbettung mit Paraffin ist zur Herstellung dünner Schnitte unbrauchbar, da sie viel zu weich ist. 1948 ent-

wickelten PEASE und BAKER (89) eine verbesserte Einbettungsmethode, indem sie eine kombinierte Collodion:Paraffinlösung herstellten. Die Lösung war brauchbar, aber einen großen Schritt kam man erst weiter, als NEWMAN et al. (83) polymerisierendes Butyl-Methacrylat verwandten.

Das neue Einbettungsmittel war so hart, daß sich auch ultradünne Schnitte unter 1000 Å gut schneiden ließen.

Erst 1956/1958 kam ein weiteres Einbettungsmittel hinzu: "Araldit" ein Epoxyharz, welches von GLAUERT et al. (30) und GLAUERT und GLAUERT (31) vorgestellt wurde. Ein zweites Epoxyharz "Epon" wurde entwickelt, FINK (25) LUFT (65) beschrieben Einbettungsverfahren, die Epon 812 als Grundlage hatten.

FREEMAN und SPURLOCK (24) führten "Maraglas" ein, ebenfalls ein Epoxyharz.

Ungefähr zu selben Zeit wie das erste Epoxyharz wurde von ALLENBERGER, SCHWAB und RYTER (51) ein Polyester empfohlen, der jedoch später durch "Vestopal" abgelöst wurde (RYTER und ALLENBERGER (108)). 1960 stellt KUSHIDA (54) ein Polyester-gemisch aus Rigolac 200⁴ und Rigolac 70 F vor. Mehrere Arbeitsgruppen stellten Versuche mit wasserlöslichen Einbettungsmitteln an:

GILEV (29) und FERNANDEZ-MORAN (23) mit Gelantine,
GIBBONS (27) (28) mit Aquon, einem Extrakt aus Epon 812,
STÄUBLI (114) mit einem Plexiglas "Durcupan",
ROSENBERG (102) mit einem "Glycolmethacrylat",
Mc LEAN und SINGER (45) mit einem Polyampholyt.

Heute werden vornehmlich Methacrylat, die drei Epoxyharze: Araldit, Epon 812, Maraglas und der Polyester Vestopal als Einbettungsmittel benutzt.

Methacrylat penetriert leicht in die Gewebe, der Härtegrad ist variabel, so daß es zum gebräuchlichsten Einbettungsmittel in der Elektronenmikroskopie wurde (32). Nachteilig wirkt sich die Schrumpfung aus, die leicht zur Schädigung des Gewebes (95) führt und die Instabilität unter Elektronenbeschuß. Mängel, die von den Epoxyharzen weit weniger verursacht werden (32). Dafür ist die Penetrationsgeschwindigkeit der Epoxyharze langsamer.

Am schlechtesten durchdringt Araldit die Gewebe und zeigt den schwächsten Kontrast. Zudem enthält es in den verschiedenen Ländern trotz gleichen Namens unterschiedliche Substanzen, so daß keine exakt vergleichbaren Versuche zustandekommen oder bei gleicher Methode unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden.

Das dünnflüssigere Epon penetriert schneller, liefert aber einen schlechteren Kontrast (95).

Maraglas dringt von den drei Epoxyharzen am leichtesten in die Gewebe ein und läßt sich in großen Schnitten schneiden (95).

Entwicklung neuer Mikrotome und Messer

Die Voraussetzung, mit Mikrotomen Schnittdicken von 100 - 2000 Å herzustellen, erfordert einen genau kontrollierbaren und fein einzustellenden Vorschub.

erfolgreich in dieser Hinsicht zeigte sich 1948 die mit einem mechanischen Vorschub ausgerüstete Modifikation des "Spencer-rotary microtomes" nach PEASE und BAKER (89) und 1949 des "Cambridge rocking microtomes" nach BRETSCHEIDER (10). NEWMAN et al. (82) entwickelten 1949 die Methode des thermischen Vorschubs.

Eine weitere Notwendigkeit bestand darin, scharfe Messer herzustellen, die in den kleinen Schnitten so wenig wie möglich Scharten hinterlassen. Neben geschliffenen Rasierklingen (43) oder Glasmessern (60), die auch heute fast ausschließlich verwandt werden, schlagen FERNANDEZ und MORAN (22) den Gebrauch von Diamantmessern vor. Sie zeichnen sich besonders durch lange Haltbarkeit aus, während die Glasmesser den Vorteil haben, billiger und leicht herstellbar zu sein.

BAKER (4) würdigt diese Zeitspanne der Entwicklung mit den Worten: "Das Jahr 1952 markiert den Beginn der elektronenmikroskopischen Histologie, wie wir sie bis heute kennen". Gleichzeitig wurde es ein neuer Anstoß, auch in der Lichtmikroskopie neue Wege zu gehen.

Der Semidünnschnitt

Entstehung und Anwendung

Die neuen Kunststoffeinfettungen und die Entwicklung der Ultramikrotome erlauben das serienmäßige Herstellen dünner Schnitte für das Elektronenmikroskop. An diesen kann man sich nur schwer über den Aufbau des Gewebes orientieren, da sie sehr dünn, ungefärbt und kontrastarm sind. Ein weiterer Nach-

teil ist, daß der an sich schon kleine Gewebeblock für das Ultramikrotom zugetrimmt werden muß, dabei Gewebe verloren geht und man keine Gewißheit hat, ob der interessierende Anteil angespitzt ist. Eine genaue Kenntnis des Bereichs erspart unnütze Schnittherstellung und gewährleistet gezieltes Arbeiten.

Man schneidet von einem nur sparsam angetrimmten Block einen Querschnitt, der dicker ist, als Schnitte für das Elektronenmikroskop und dünner, als diejenigen für das Lichtmikroskop. Es entsteht im Gegensatz zu den elektronenmikroskopischen "Ultradünnschnitten" ein "S e m i dünnschnitt", der unter dem Lichtmikroskop beurteilt wird.

Der oben erwähnten Anwendung als Orientierungsschnitt, folgte der Gebrauch als Kontrollschnitt, um bekannte lichtmikroskopische Strukturen mit den elektronenmikroskopisch gewonnenen Erkenntnissen zu vergleichen.

Es läßt sich die Schrumpfung und Quellung der Zellbestandteile (95) durch Fixieren für die Kunststoffeinbettung beurteilen.

Ferner lassen sich histochemische Nachweisreaktionen, Autoradiographie und elektronische Feinstrukturen vergleichen (95).

Nicht zuletzt sind diese Schnitte auch speziell für das Lichtmikroskop zu verwenden, da die Dünne bessere Informationen über Faserstrukturen, Anordnung einzelner Gewebeteile und insbesondere auch über die einzelnen Zellen geben kann und eine differenziertere Beurteilung erlaubt.

FÄRBETECHNIKEN ANGEWANDT AM SEMIDÜNNSSCHNITT

Tabellarische Übersicht der Färbungen am Semidünnschnitt mit verschiedenen Einbettungsmitteln

Zahlreiche Versuche wurden unternommen, Gewebe, die in polymerisierenden ultradünn schneidbaren Medien eingebettet sind, zu färben. Man wollte sie gleichzeitig mit der normalen Histologie verarbeiten und wie diese in großer Zahl herstellen und unter dem Mikroskop betrachten. Schwierigkeiten ergaben sich, als man feststellte, daß die Farbtintensität - erreichbar mit den gängigen Färbungen - unzulänglich war.

Es wurde nach neuen Methoden gesucht, die eine Verbesserung besonders im Hinblick auf den Kontrast bringen sollten. Methacrylat, das sich aus den Schnitten entfernen ließ, bot nicht so große Schwierigkeiten wie die Epoxyharze, die sich nur schwer herauslösen ließen (81, 107).

MAYOR (73) entwickelte ein Verfahren zum Lösen des Epoxyharzes Araldit. Gleichzeitig versuchte man Färbungen zu entwickeln, die auch anwendbar waren, wenn das Mittel den Schnitt umgab.

Eine große Anzahl Lösungen wurden probiert. Man verwandte alkoholische Lösungen an Stelle von wässrigen (95, 118) oder benutzte alkalische Lösungen (97), um die Farbtintensität zu erhöhen. Auch das Erwärmen der Schnitte oder Farbmischungen sollte sich günstig auswirken (68, 67). Der pH-Wert wurde erhöht (121), Versuche mit den verschiedensten Nachfärbungen wurden angestellt (78, 118), oder man variierte die Alkohol-

imprägnationszeit, alles, um bessere Färbungsergebnisse zu erzielen.

Nachfolgend geben wir eine Aufstellung der für die einzelnen Medien gefundenen Techniken.

Einbettung: METHACRYLAT

Name	Schnitt- dicke μ	Färbung	Fixation
BLOCH (7)	0,5 - 1,0	Toluidinblau	OsO_4
CALVO (15)	0,5	Silberimprägnation (Blockfärbung)	1. Formaldehyd in mehreren Varianten
DODGE (17)	0,25 - 1,0	1. Azur B 2. Malachitgrün	Formalin nach- fixiert mit OsO_4
FRANKEL-POLG (19)	0,5 - 2,0	Paraphenylendiamin	OsO_4
FRANKEL (15)	0,5 - 1,0	Alkoholische Lösung glei- cher Teile Toluidinblau und Malachitgrün. Gegen- färbung mit basischem Fuchsin	1. OsO_4 2. Glutaralde- hyd nach- fixiert mit OsO_4
HOLCK (15)	0,25-10,0	1. Hämatoxylin/Eosin 2. Methyl-/Toluidinblau 3. Silbermethode 4. PAS 5. Drei-Farben-Färbung 6. Färbung elastischer Fasern	1. OsO_4 /Veronal Mischung 2. Flüssigkeit nach Zenker und Helly 3. Formalin
JENNINGS (19)	1,0 - 2,0 1,0 - 2,0 und 4,0 - 6,0 4,0 - 6,0	1. Fuchsin-Alaun-Häma- toxylin 2. Hämatoxylin/Eosin 3. kolloidale Eisen- varianten 4. Azan 5. PAS 6. Methylviolett	OsO_4

Einbettung: M E T H A C R Y L A T

Name	Schnitt- dicke μ	Färbung	Fixation
LAFONTAINE (56)	1,0	1. PAS 2. Borsäures Methylenblau 3. Basisches Fuchsin	OsO_4
LYNN (66)	0,5 - 2,0	Toluidinblau	OsO_4
MARINOZZI (69)	0,1 - 0,3	Silberimprägnation	1. OsO_4 2. $KMnO_4$ 3. Formol
MOVAT (80)	ohne Angabe	1. Perjodsäure-Silber- Hexamethylentetramin 2. Protargol	1. OsO_4 2. Formalin 3. Orth's Lösung
MUNGER (81)	0,5 - 2,0	1. H&P 2. PAS mit Hämatoxylin Gegenfärbung 3. Aldehyd-Fuchsin 4. Drei-Farben-Färbung für Sekretionsnachweis	OsO_4
PARADISI (88)	0,1 - 0,2	Silberimprägnation	OsO_4
RUNGE (106)	0,5 - 1,0	Gallocyanin-Chrom- phloxin B	OsO_4
STUART (115)	1,0 - 4,0	Thionin	OsO_4
SUSUKI (116)	ohne Angabe	Silberimprägnation	OsO_4
THOENES (118)	1,0 - 1,0	Giemsa	OsO_4
WELSH (126)	1,0	PAS	OsO_4

Einbettung: A R A L D I T

Name	Schnitt- dicke μ	Färbung	Fixation
ARKI (2)	0,5 - 1,0	Toluidin/basisches Fuchsin	Glutaraldehyd nachfixiert mit OsO_4
APARICIO (3)	0,5 - 1,0	1. Hämatoxylin/Eosin 2. Hämatoxylin/Phloxin	1. Glutaralde- hyd 2. Formaldehyd nachfixiert mit OsO_4
BERKOWITZ (9)	0,5 - 1,0	eisenhämatoxylin	Formaldehyd/ Glutaraldehyd- mischung nach- fixiert mit OsO_4
BRYAN (11)	0,5 - 1,5	1. Methylene-/Azurblau 2. Toluidinblau	1. OsO_4 2. Glutaralde- hyd nach- fixiert mit OsO_4
DODGE (17)	0,5 - 1,0	1. Azur B 2. Feulgen-Reaktion	Formalin nach- fixiert mit OsO_4
GRINLEY (35)	0,5 - 2,0	Äthanolische Lösung glei- cher Teile Toluidinblau und Malachitgrün. Gegen- färbung mit basischem Fuchsin	1. OsO_4 2. Glutaralde- hyd nach- fixiert mit OsO_4
HOLLÄNDER (44)	0,5 - 1,0	P-Phenylendiamin	Formol nach- fixiert mit OsO_4
JEON (50)	0,3 - 2,0	Azur 11	ohne Angabe

Einbettung: A R A L D I T

Name	Schnitt- dicke μ	Färbung	Fixation
MARTINO de (71)	1,0 - 2,0	1. Toluidinblau 2. Sudan III 3. Sudanschwarz 4. Nilblau	OsO ₄
Mc GEE RUSSEL (74)	1,0	1. Sudanschwarz B 2. Nilblau	1. OsO ₄ 2. Formaldehyd
RICHARDSON (97)	0,25-1,0 1,0	Azur-II-Methylenblau Phloxin-Methylenblau	OsO ₄
RIEDEL (98)	0,2 - 2,0	Toluidinblau (schnelle Methode)	OsO ₄
SHIRES (111)	0,5 - 2,0	Hämatoxylin und Gegen- färbung mit Phloxin	1. OsO ₄ 2. Glutaraldehyd nach- fixiert mit OsO ₄

Einbettung: M A R A G L A S

Name	Schnitt- dicke μ	Färbung	Fixation
BRYANT (11)	0,5 - 1,5	1. Methylen-/Azurblau 2. Toluidinblau	1. OsO_4 2. Glutaraldehyd nach- fixiert mit OsO_4
SPURLOCK (112)	1,0 - 2,0	Toluidinblau	Formalin nach- fixiert mit OsO_4
SPURLOCK (113)	0,5 - 1,5	1. Paragon 1301 2. Blockfärbung mit Paragon 1301	1. Glutaraldehyd nach- fixiert mit OsO_4 2. OsO_4 /Glutaraldehyd- Mischung

Einbettung: E P O N

Name	Schnitt- dicke μ	Färbung	Fixation
AOKI (2)	0,5 - 1,0	Toluidinblau/basisches Fuchsin	Glutaraldehyd nachfixiert mit OsO_4
APARICIO (3)	0,5 - 1,0	1. Hämatoxylin/Eosin 2. Hämatoxylin/Phloxin	1. Glutaraldehyd 2. Formaldehyd nachfixiert mit OsO_4
BRYANT (11)	0,5 - 1,5	1. Methylen-/Azurblau 2. Toluidinblau	1. OsO_4 2. Glutaraldehyd nach- fixiert mit OsO_4
CARDNO (13)	0,5 - 2,0	1. PAS 2. PAS-M	1. OsO_4 2. Glutaraldehyd
CHANDRA (14)	0,5 - 1,0	1. Toluidinblau 2. Basisches Fuchsin	ohne Angabe
ESTABLE-PUIG (19)	0,5 - 2,0	Paraphenylendiamin	OsO_4
GRIMLEY (35)	0,5 - 1,0	Äthanolische Lösung gleicher Teile Toluidinblau und Malachitgrün. Gegenfärbung mit basischem Fuchsin.	1. OsO_4 2. Glutaraldehyd nach- fixiert mit OsO_4
HUBER (46)	1,0	Basisches Fuchsin / alkalisiertes Methylen	1. OsO_4 2. Glutaraldehyd 3. Glutaraldehyd nach- fixiert mit OsO_4

Einbettung: E P O N

Name	Schnitt- dicke μ	Färbung	Fixation
ITO (48)	0,5 - 2,0	1. Methylenblau/Azur II 2. Toluidinblau	OsO ₄
LASCHI (59)	0,5	1. Hämatoxylin/Eosin 2. Pianese 3. Toluidinblau 4. PAS	1. OsO ₄ 2. Glutaraldehyd nachfixiert mit OsO ₄
LEESON (63)	0,5 - 2,0	1. Toluidinblau/Safranin 2. Methylenblau 3. Azur-/Methylenblau 4. Van Gieson 5. PAS	Glutaraldehyd nachfixiert mit OsO ₄
LYNN (66)	0,5 - 2,0	Toluidinblau	OsO ₄
MADEMAN (68)	0,5 - 2,0	Toluidinblau	ohne Angabe
MARTINO de (71)	1,0 - 2,0	1. Toluidinblau 2. Sudan III 3. Sudanschwarz 4. Nilblau	OsO ₄
MATAGAS (72)	0,5 - 3,0	1. Hämatoxylin 2. Azan 3. Van Gieson 4. Silberimprägnation 5. Hale-Reaktion 6. Rutheniumrot 7. Feulgen-Reaktion 8. Gallozyanin-Chromalaun-Reaktion 9. PAS	1. Glutaraldehyd nachfixiert mit OsO ₄ 2. Glutaraldehyd 3. OsO ₄
Mc GEE RUSSEL (74)	1,0	1. Sudanschwarz B 2. Nilblau	1. OsO ₄ 2. Formaldehyd

Einbettung: E P O N

Name	Schnitt- dicke μ	Färbung	Fixation
MUNGER (81)	0,5 - 2,0	1. H&P 2. PAS mit Hämatoxylin Gegenfärbung 3. Aldehyd-Fuchsin 4. Drei-Farben-Färbung für Sekretionsnachweis	OsO ₄
PENTTILÄ (91)	0,5 - 1,0	1. Silbermethode 2. Silbermethode mit Protargol	Glutaraldehyd nachfixiert mit OsO ₄
POOL (94)	0,5 - 2,0	Hämatoxylin/Eosin nach vorheriger Oxydation durch H ₂ O ₂	OsO ₄
RIEDEL (98)	0,2 - 2,0	Toluidinblau (schnelle Methode)	OsO ₄
ROSEN (100)	0,5	Methylenblau/Azur II	OsO ₄
SCHANTZ (109)	0,8 - 1,6	Eisenhämatoxylin/Safranin	OsO ₄
SHIRES (111)	0,5 - 2,0	Hämatoxylin Gegenfärbung mit Phloxin B	1. OsO ₄ 2. Glutaraldehyd nach- fixiert mit OsO ₄
SPURLOCK (113)	0,5 - 1,5	1. Paragon 1301 2. Blockfärbung mit Paragon 1301	1. Glutaraldehyd nach- fixiert mit OsO ₄ 2. OsO ₄ /Glutaraldehyd- Mischung
TANAKA (117)	1,0	Eisenfärbung	ohne Angabe

Einbettung: E P O N

Name	Schnitt- dicke μ	Färbung	Fixation
TRUMP (121)	0,5 - 2,0	Toluidinblau	OsO_4
WINKELSTEIN (127)	1,0	Basisches Fuchsin	Chrom-Osmium- Gemisch
WOOD (129)	1,0	1. PAS-Eisenhämatoxylin 2. Basisches Methylenblau -Azur II	OsO_4

Einbettung: V E S T O P A L

Name	Schnitt- dicke μ	Färbung	Fixation
BRYANT (11)	0,5 - 1,5	1. Hämatoxylin 2. PAS 3. Gegenfärbungen mit Organe G und Eosin Y	1. OsO_4 2. Glutaraldehyde nach- fixiert mit OsO_4
MARINOZZI (69)	0,1 - 0,3	Silberimprägnation	1. OsO_4 2. KMnO_4 3. Formol
MARTINO de (71)	1,0 - 2,0	1. Toluidinblau 2. Sudan III 3. Sudanschwarz 4. Nilblau	OsO_4
MATAKAS (72)	0,5 - 3,0	1. Hämatoxylin 2. Azan 3. Van Gieson 4. Silberimprägnation 5. PAS 6. Hale-Reaktion 7. Rutheniumrot 8. Feulgen-Reaktion 9. Galloxyanin-Chrom- alaun-Reaktion	1. OsO_4 2. Glutaraldehyde 3. Glutaraldehyde nach- fixiert mit OsO_4
MOE (77)	1,0 - 1,5	Kobaltsulfid	OsO_4
MOE (78)	1,0 - 1,5	Rückgängiggemachte Kobald- sulfidfärbung anschlies- send: 1. PAS 2. Feulgen-Reaktion 3. Orcein 4. Saures Fuchsin 5. Alcianblau 6. Pyronin	OsO_4

Einbettung: V E S T O P A L

Name	Schnitt- dicke μ	Färbung	Fixation
RIEDEL (98)	0,2 - 2,0	Toluidinblau (schnelle Methode)	OsO_4
RÜDLBERG (105)	0,75	Wässrige Lösung von Methylenblau, Thionin und Na_2PO_4	1. OsO_4 2. Glutaral- dehyd/ OsO_4 Mischung
SCHWALBACH (110)	1,0 - 2,0	1. Saures Hämalaun 2. Eisenhämatein 3. Eisenhämatoxylin 4. Saures Karmin 5. Pikrofuchsin 6. Giemsa	OsO_4
THOENES (118)	1,0 - 2,0	Giemsa	OsO_4
TZITSIKAS (124)	0,1 - 2,0	Silberlösung mit Vorbehandlung	OsO_4
TZITSIKAS (123)	0,2 - 1,0	1. Thionin-Azur-Fuchsin 2. Thionin-Azur als Ge- genfärbung für PAS	OsO_4
TZITSIKAS (125)	0,2 - 1,0	Sudan III-O-Thionin-Azur	OsO_4

Einbettung: CELLOIDIN / PARAFFIN

Name	Schnitt- dicke μ	Färbung	Fixation
GRISHMAN (38)	0,5	1. PAS 2. Hämatoxylin-Eosin 3. Mallory-Roque Anilinblau	ohne Angabe

Wie aus der Tabelle ersichtlich, können unterschiedliche Ergebnisse mit den einzelnen Färbungen erzielt werden. THOENES (118) zieht den Schluß, daß die Strukturhaltung durch die neuen Einbettungsmittel mindestens gleichwertig der, der klassischen Methoden ist. Die Klarheit der Bilder ist bestechend, wohl vor allem aufgrund der geringen Schnittdicke und der guten Lageerhaltung der Strukturen durch die Einbettungsmittel. Allgemein sind die Konturen zart und wegen der Dünne kontrastreich.

Charakteristische Färbungen lassen eine exakte Identifizierung morphologischer Einzelheiten zu (110). Zytologische Details lassen sich direkt mit der Ultrastruktur, beurteilt im Elektronenmikroskop, vergleichen (81).

Oft werden unterschiedliche Ergebnisse der Versuche oder Reaktionen der Farben auf die differenten Einbettungsmittel bezogen (3, 35, 80, 81).

Nach REIMERS (95) lassen sich die besten Ergebnisse mit Methacrylat und in abnehmendem Maß mit Vestopal, Epon und Araldit erreichen.

EIGENE VERSUCHE

Anwendung einiger Färbetechniken

Am beeindruckendsten für uns war die MOVATsche Silberimprägnation. Bestechend klar stellten sich die Kapillaren der Glomerula und die retikulären Fasern dar, auch die Basalmembran ließ sich in ihrer Dicke genauestens beurteilen. Unsere eigenen Studien hatten nun das Ziel, die Möglichkeiten der vorhandenen Versilberungstechnik nach MOVAT zu beurteilen und deren Anwendung im Vergleich zu den anderen Verfahren aufzuzeigen.

Das von uns für die Färbungen verwandte Material, Gewebe der normalen menschlichen Brustdrüse, war routinemäßig für die elektronenmikroskopischen Zwecke präpariert worden. Später machten wir vergleichende Färbeproben an Fibroadenom, Gynäkomastie, Mastopathia chronica cystica, Carcinoma gelatinosum mammae, Carcinoma cirrhosum mammae, Paget-Karzinom, Rattenniere, -leber, -lunge und Rattendarm.

Die Gewebe wurden für ca. 1 Stunde mit 6,25 %igem Glutaraldehyd, in Cacodylatpuffer gelöst und fixiert, danach in Saccharose-Cacodylatpufferlösung gespült, anschließend für 2 - 4 Stunden in 2 %iger, gepufferter OsO_4 -Lösung nachfixiert. Als Puffer diente der Millong-Puffer, in dem noch das Auswaschen folgte. Zur Entwässerung benutzten wir die aufsteigende Acetonreihe. Die Einbettung erfolgte in Durcupan- A C M der Firma Fluca/Schweiz, das dem amerikanischen Einbettungsmittel Araldit entspricht. Die Semidünnschnitte wurden mit Glasmessern auf dem Porter Blum-Ultramikrotom hergestellt.

Die Schnittdicke reichte von 0,5 - 2 μ . Unseren Erfahrungen nach lag der Idealschnitt bei 1 μ Dicke. Die Blöcke wurden so groß wie möglich zugetrimmt, so daß die Anschnittfläche der Breite des eingebetteten Gewebeblockes entsprach. Die Schnitte wurden mit Hilfe sehr dünner Pinsel aufgefangen und transportiert. Anschließend wurden sie auf einen Glasobjektträger gebracht und luftgetrocknet, wodurch sie der Unterlage gut anhafteten.

Eine zweite Möglichkeit ist, die Schnitte aus dem Wassertrog in kleine Schälchen mit Aqua bidest. zu bringen, in denen man sie unter Verschuß für längere Zeit sauber aufbewahren kann.

Die Semidünnschnitte wurden nach folgenden Verfahren gefärbt:

1. Giemsa (nach THOENES, 118)
2. Toluidinblau
3. Eisenhämatoxylin
4. Nilblau (Mc GEE RUSSEL, 74)
5. Silberimprägnation (nach NOVAT, 80, 12)
6. Sudanschwarz (Mc GEE RUSSEL, 74)

Unsere Versuche ergaben sehr unterschiedliche Ergebnisse. Die Giemsa-, Toluidinblau-, Nilblau- und Sudanschwarzfärbungen zeigten nur schwache Wirksamkeit. Die Schnitte waren diffus zart verfärbt, ohne deutlich die Feinheiten zu unterscheiden. Besonders schlecht stellten sich bei allen vier Methoden die Drüsenepithelien dar. Bei der Giemsafärbung wurde das Bindegewebe ausreichend blau, die Drüsen nur schwach angefärbt. Toluidin zeigt das Bindegewebe blau, die Epithelien aber nur sehr zart bläulich verändert.

Nilblau und Sudanschwarz wirkten auf die Schnitte im ganzen nur ungenügend ein und eigneten sich nicht für Araldit eingebettetes Gewebe.

Modifikation der Versilberung nach MOVAT

Die besten Ergebnisse hatten wir mit der Versilberung nach MOVAT (80). Aber besonders mit der Darstellung der Drüsenepithelien und Kerne waren wir auch hier nicht zufrieden, da sie eine sichere Orientierung über die Zell-, insbesondere die Kernstruktur, infolge der kontrastarmen Imprägnation, nicht zuließ.

Die ersten Färbungen hatten wir nach folgender Anweisung vorgenommen:

- 40 ml 3 %ige Hexamethylentetraminlösung
- 5 ml einer 5 %igen Silbernitratlösung zugeben, gut mischen und
- 5 ml einer 3 %igen Boraxlösung zugeießen.

Färbetechnik:

1. 1 %ige Perjodsäure, 20 min einwirken lassen
2. Aqua dest., zweimal wechseln, für je 5 min
3. Mit der Silberlösung bei 50°-60°C im Brutschrank bis zu 120 min die Schnitte imprägnieren
4. Gründlich in Aqua dest abspülen
5. 3 %iges Natriumthiosulfat für 5 min

6. Aufziehen der Schnitte auf Objektträger
7. 10 %iges wässriges Aceton mit der Pipette auf den Objektträger träufeln, 5 min wirken lassen
8. Ein Tropfen 100 %iges Aceton
9. Xylol für mindestens 20 min
10. Eindecken in Eukitt

Wir versuchten nun, die Versilberung zu modifizieren, um eine Steigerung des Kontrastes zu erwirken. Eine Erhöhung der von ROVAT (80) angegebenen Konzentration der Perjodsäure, variiert in kleinen Stufen von 1 % - 5 %, brachte keine besseren Ergebnisse. Wir verlängerten oder verkürzten die Einwirkungszeit der Silberlösung. In mehreren Färbegängen wurde die Imprägnationszeit von 30 min in 15 min Abständen bis zu 180 min gesteigert. Aber auch hiermit ließ sich keine Verbesserung in der Anfärbbarkeit der Drüsenepithelien und Kerne erreichen.

Auch eine Erhöhung der Temperatur des Brutschrankes in 5°C Abständen hatte keinen Erfolg, die Schnitte waren zu intensiv und diffus schwarz verfärbt.

Nachträgliche Färbung mit Kernechtrot markierte die Schnitte nur unzureichend, da wohl eine Rotfärbung des Präparates, aber kein deutliches Hervortreten der Kerne zu beobachten war.

Die Anwendung der WEIGERTschen Lösung als Gegenfärbung brachte auch keinen Vorteil, diesmal zeigten sich gehäuft Verunreinigungen. Beide letztgenannten Methoden wurden in mehreren Versuchen und nach erneutem Ansetzen der Lösungen ausprobiert,

so daß Fehler in der Methodik auszuschließen waren. Jeder Färbegang wurde mit mindestens 10 - 20 Schnitten durchgeführt, jeder wurde einzeln ausgeführt, um ein genaues Einhalten der Färbvorschriften zu gewährleisten und möglichst gleiche Bedingungen zu schaffen.

Die aus der Elektronenmikroskopie bekannte, gut kontrastbringende Wirkung des kaliumpermanganats, versuchten wir anzuwenden, indem wir KMnO_4 der ganzen Prozedur vorschalteten. PERDRAU (92) beschrieb eine Methode, bei der KMnO_4 als Vorbehandlung einer Versilberung am Paraffinschnitt benutzt wurde. PERDRAU ließ 0,25 %iges KMnO_4 für 3 min auf die Schnitte einwirken, spülte anschließend in Aqua dest. und legte sie für 5 min in 1 %ige Oxalsäure, um sie abschließend für 3 - 4 Stunden in Aqua dest. zu wässern. GÖMÖRI (33) verwendete statt Oxalsäure Kaliummetabisulfit, somit wurde das abschließende Spülen auf ein paar Minuten verkürzt. Wir suchten eine der GÖMÖRI ähnliche Methode, da sich die oben beschriebene für Durcupan eingebettetes Gewebe nicht ohne Veränderung übernehmen ließ.

In einer großen Versuchsreihe wurden sowohl die Konzentration des KMnO_4 als auch die des $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ verändert. Vergleichend wurde von uns die Einwirkungszeit beider Substanzen variiert und durch Kombination der verschiedenen Möglichkeiten die Versuchsanordnung gefunden, die die besten Ergebnisse zeigte.

Zum Abschluß versuchten wir die MOVATsche Technik in Anbetracht unserer Vorbehandlung abzukürzen. Doch die Erfahrung erforderte das fast unveränderte Beibehalten der MOVAT-Versilberung; bei besonders dünnen Schnitten wurde zeitweise eine Verlängerung der Imprägnation im Brutschrank nötig.

Unsere Behandlung der Semidünnschnitte vor der Versilberung brachte uns den geforderten höheren Kontrast und ließ die Kerne deutlich hervortreten.

Färberische Voraussetzungen durch Kaliumpermanganat

Kaliumpermanganat, eines der stärksten Oxydationsmittel, findet seit langem Anwendung in der histologischen Präparation und Technik, so zum Bleichen von Pigmenten (1), bei einigen Markscheidenfärbungen (85), bei Osmium-Präparaten (99), zur Reinigung von Acetonlösungen (99) und zur künstlichen Reifung einer Hämatoxylinlösung (41).

Von PERDRAU (92) wurde es mit einbezogen zur Vorbehandlung der BIELSCHOWSKYschen Silberimprägnation.

In der Elektronenmikroskopie wurde KMnO_4 1956 von LUFT (64) als Fixationsmittel eingeführt. LAWN (61) gebrauchte es als Kontrastionsmittel. GRIMLEY baute es in eine Beizung für Semidünnschnitte ein (37).

In unserer Färbung erfüllt KMnO_4 seine Aufgabe als Oxydationsmittel. Obwohl die von MOVAT angegebene Methode mit der Perjodsäure schon ein Oxydationsmittel beinhaltet, konnten wir durch die Vorschaltung von Kaliumpermanganat und Kaliummetabisulfit eine Steigerung des Kontrastes erreichen. Während der Einwirkungszeit des Kaliumpermanganats auf die Schnitte wird MnO_4^- reduziert zu MnO_2 , Braunstein, der die Schnitte braun anfärbt. Nachfolgende Behandlung mit $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ reduziert MnO_2 zu Mn^{II} dem zweiwertigen Mangan, welches zum Abschluß durch H_2O herausgewaschen wird.

Von der Kunststoffeinfbettung und der vorangegangenen Fixierung mit OsO_4 kann man erwarten, daß die Gewebe in einer Weise verändert worden sind, daß sich neue Angriffspunkte für KMnO_4 bieten. Kaliumpermanganat greift unter anderem an Fetten, Zuckern, Ketogruppen an, und vielleicht werden Membranen zerrissen oder Doppelbindungen gesprengt, so daß es dort zur selektiven Oxydation kommt. Diese Veränderungen erlauben wahrscheinlich der nachfolgenden Färbung ein intensiveres Einwirken. Dadurch treten die Konturen wesentlich deutlicher hervor.

Färbevorgang

Zur der von uns mit großem Erfolg angewandten Methode benutzen wir folgende Lösungen.

A) Zur Beizung

- 1 %iges Kaliumpermanganat
- 1 %iges Kaliummetabisulfit

B) Zur Oxydation

- 1 %ige Perjodsäure

C) Zur Silberimprägnation

- 40 ml einer 3 %igen Hexamethylentetraminlösung
- 5 ml einer 5 %igen Silbernitratlösung
- 5 ml einer 2 %igen Boraxlösung

zu den 40 ml Hexamethylentetraminlösung gießt man

tropfenweise die 5 ml der Silbernitratlösung, mischt gut und gibt dann die 5 ml der Boraxlösung zu.

D) Zur Nachbehandlung

3 %iges Natriumthiosulfat
10 %iges wässr. Aceton
100 %iges Aceton
Xylol

E) Zum Spülen

Aqua dest. besser Aqua bidest.

F) Zum Eindecken

Lukitt.

1. 0,5 - 2 μ dicke Schnitte werden mit einem sehr dünnen Pinsel - der gesamte Pinsel besteht aus drei bis sechs Haaren - oder einem über dem Bunsenbrenner ausgezogenen Glasstab vom Wassertrog des Ultramikrotoms auf einen Objektträger in einen Wassertropfen oder in ein kleines Gefäß mit Aqua dest. gebracht. Von dort kann man sie je nach Bedarf zum Färben entnehmen. Auch während der Färbung werden die Schnitte mit dem Pinsel transportiert. Unserer Ansicht nach erlauben Pinsel ein diffiziles und schnelles Arbeiten.
2. Zum Betropfen mit 1 %igem Kaliumpermanganat werden die Schnitte auf einen Objektträger gelegt. Für ca. 120 min

läßt man die Lösung einwirken; fließt zwischenzeitlich etwas ab, gießt man unbedenklich nach. Die Schnitte haben jetzt eine tiefbraune Farbe.

3. Die Objektträger werden mit reichlich Aqua dest. oder bidest. überspült, bis alle KMnO_4 -Reste verschwunden sind.
4. Die Schnitte werden mit dem Pinsel in ein Gefäß mit Kaliummetabisulfit gebracht. Die Einwirkungszeit ist unterschiedlich und richtet sich nach Schnittdicke und Bräunung durch das Kaliumpermanganat, sie dauert so lange, bis die Schnitte wieder zart hellgelb und gerade noch zu sehen sind. Die Aufhellungszeit liegt ca. zwischen 20 sec und 2 min.
5. Danach sofort in reichlich Aqua bidest. spülen.
6. Die Schnitte kommen für 20 min in 1 %ige Perjodsäure.
7. Abspülen in Aqua bidest., 2 mal wechseln für je 5 min.
8. Die Schnitte werden in ein Gefäß mit der Silberlösung gebracht und im Brutschrank bei 60°C für 90- 120 min imprägniert. Eine Kontrolle unter dem Mikroskop oder mit einem Biocular ist möglich und empfehlenswert. Die Schnitte werden auf einem Objektträger begutachtet und anschließend wieder in die Lösung zurückgegeben.
9. Gründliches Spülen in Aqua bidest.
10. Für 5 min werden die Schnitte in 3 %igem Natriumthiosulfat fixiert.

11. Jetzt werden die Schnitte einzeln auf Objektträger aufgezogen und mit 10 %igem wässrigem Aceton beträufelt, das man 5 min einwirken läßt und den überschüssigen Rest mit Filterpapier entfernt.
12. kurzes Entwässern mit 2 - 3 Tropfen Aceton, danach liegen die Schnitte fest auf dem Objektträger.
13. Für mindestens 10 min werden die Objektträger mit Xylol begossen. Gut abtropfen lassen.
14. Eindecken in Lukitt.
15. Jeder Objektträger trägt einen einzelnen Schnitt, dieser wird mit kleinen Metallgewichten beschwert, damit die Schnitte wirklich plan werden.
16. Den Objektträger mindesten 1 Tag mit den Gewichten beschweren und das Lukitt trocknen lassen.

Anmerkungen zur Färbetechnik

1. Die zum Ansetzen der Lösungen benutzten Gefäße müssen chemisch sauber sein. Die Glasgeräte wurden deshalb von uns für 24 Std. in Chromschwefelsäure gelegt, so daß wir die Garantie für Reinheit hatten.
2. Alle Lösungen müssen täglich frisch und möglichst mit Aqua bidest., mindestens mit Aqua dest. angesetzt werden.
3. Fängt man die Schnitte nach dem Schneiden auf einem Objektträger auf und läßt sie länger liegen, ist es möglich, daß

man einige Schnitte verliert, weil sie sich nicht mehr ablösen. Da sie sich aber unkompliziert aufbewahren lassen, ist diese Methode bei ausreichendem Material doch zu gebrauchen, sobald man einige Schnitte mehr anfertigt, als unbedingt gebraucht werden.

4. Zur Erleichterung beim Suchen und Auffangen der Schnitte aus der KMnO_4 -Lösung legen wir unter die Gefäße ein helles Stück Papier und beleuchten mit einer Lampe, man spart dadurch Zeit.
5. Man muß beachten, daß Kaliummetabisulfit die Schnitte in 20 sec - 2 min fast ganz entfärbt. Um keinen Schnitt zu verlieren, legt man höchstens bis zu drei Schnitte in die Lösung, was den Erhalt aller Schnitte gewährleistet.
6. Beim Ansetzen der Silberlösung achte man auf genaues Abwiegen. Silbernitrat tropft man vorsichtig unter stetigem Schütteln in die Hexamethylentetraminlösung. Das Gemisch muß klar sein. Nachdem man die Boraxlösung als drittes hinzugegeben hat, läßt man es 20 min stehen, filtriert ab und legt sofort die vorbehandelten Schnitte in die Silberlösung.
7. Mit Aceton darf nur sehr vorsichtig umgegangen werden, wenn das Gewebe - wie z.B. Lungengewebe - nicht kompakt ist, zerreißt es bei der Entwässerung sehr leicht.
8. Um die vorgeschriebenen Färbezeiten einzuhalten, dürfen nicht zu viele Schnitte auf einmal - maximal 20 Schnitte pro Färbegang - aufgearbeitet werden, da die Schnitte schwimmend gefärbt und mit dem Pinsel aufgefangen werden müssen und dieser Transportvorgang wesentlich mehr Zeit als bei den üblichen Methoden beansprucht.

9. Es empfiehlt sich, in kleinen Gefäßen zu färben, da sie sich gut überblicken lassen, und zum anderen der Verbrauch an Lösungen geringer ist.

Wir versuchten die aufwendige und zeitraubende Methode des schwimmenden Färbens von Semidünnschnitten durch andere Methoden zu ersetzen.

1. Die Schnitte wurden durch Antrocknen im Brutschrank auf den Objektträgern befestigt. Diese Methode empfiehlt sich nicht, da die Schnitte nach der Silberimprägnation nicht richtig sauber zu bekommen waren und das Präparat durch Silberkörnchen verunreinigt war.
2. Die Objektträger wurden mit Eiweißgelatine eingerieben und die Schnitte vor der Färbung auf die so vorbereiteten Träger gebracht. Auch hierbei traten Verunreinigungen und Ablagerungen während der Silberimprägnation auf.
3. Wir beschichteten die Objektträger, auf denen die Schnitte lagen, mit 0,5 %igem Celludin, um ein Abschwimmen zu verhindern, mußten aber auch hier störende Verunreinigungen und mangelnde Färbung hinnehmen.
4. In einem weiteren Versuch fertigten wir uns kleine Objektträger an, indem wir mit einem Glasschneider die üblichen Träger halbierten. Darauf brachten wir die Schnitte, ließen sie lufttrocknen und wickelten sie vor dem Färben in hauchdünnen Perlonmull. Die Schnitte lösten sich natürlich auch hier vom Objektträger, ließen sich aber gut und schnell im Mull finden. Da sie jedoch bei dieser Methode leicht umknicken und sich vor allem nicht beobachten las-

sen, sind wir von dieser Art des Transports wieder abgekommen, dennoch kann sie bei anderen Färbeverfahren von Nutzen sein, da man das zeitraubende Suchen nach den Schnitten erspart.

5. Während unserer Versuche machten wir die Beobachtung, daß sich die kleinen, in Eukitt eingedeckten Semidünnschnitte nur schwer bei Ölimmersion unter dem Lichtmikroskop scharf beobachten und fotografieren ließen, da sie nicht ganz plan waren. Wir ließen uns deshalb kleine Eisengewichte anfertigen, die wir auf die frisch eingedeckten Schnitte nach einer Wartezeit von 10 min mit sanftem Druck aufsetzten. Wir empfehlen, vor der mikroskopischen Begutachtung, die so beschwerten Schnitte für einen Tag auf einer festen, glatten Unterlage liegen zu lassen.

Beispiel für die Anwendung dieser Verfahren in der
Zytomorphologie

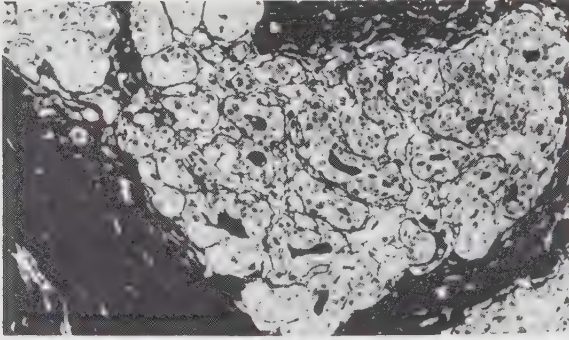


Abb. 1

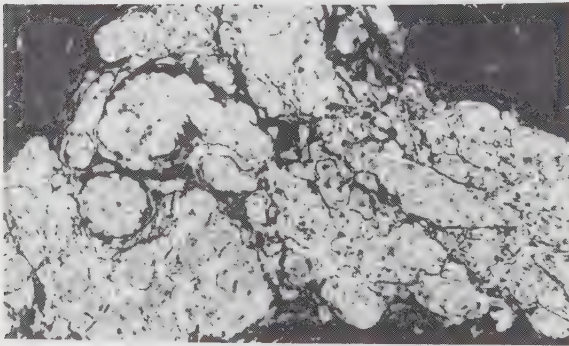


Abb. 2

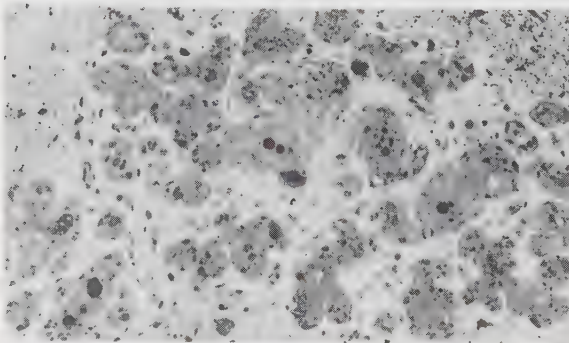


Abb. 3

Läppchen einer menschlichen Brustdrüse.
Einbettung: Durcupan ACM, Schnittdicke $1\ \mu$
Färbung: Abb. 1: KMnO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Movat
Abb. 2: Movat
Abb. 3: Giemsa

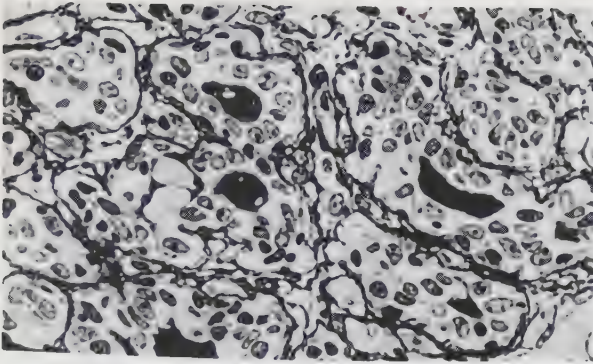


Abb. 4

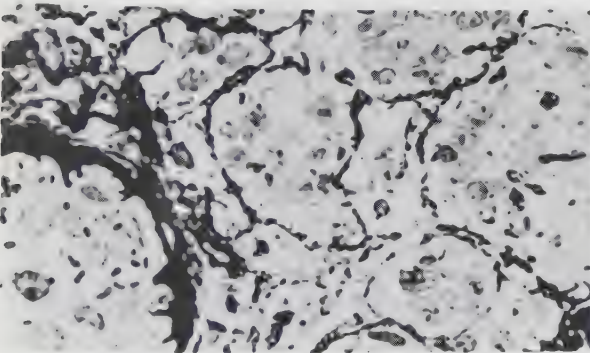


Abb. 5

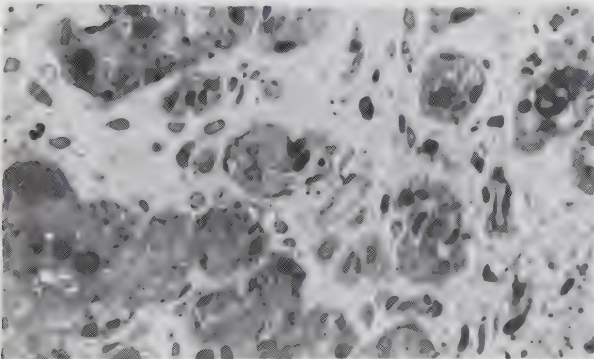


Abb. 6

Ausschnitt aus dem Lappchen einer menschlichen Brustdrüse.

Einbettung: Durcupan ACM, Schnittdicke 1 μ ,
Färbung: Abb. 4: KMnO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Movat

Abb. 5: Movat

Abb. 6: Giemsa

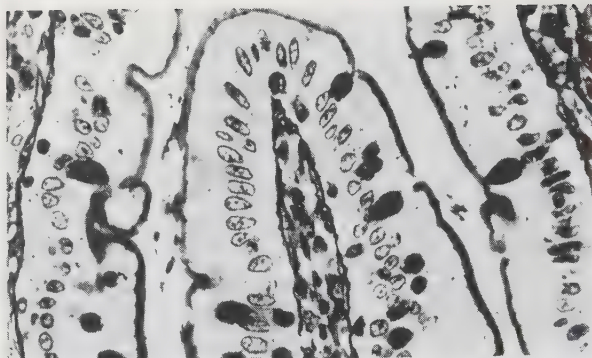


Abb. 7

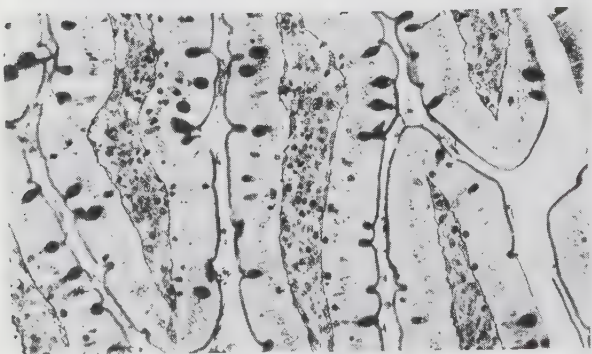


Abb. 8

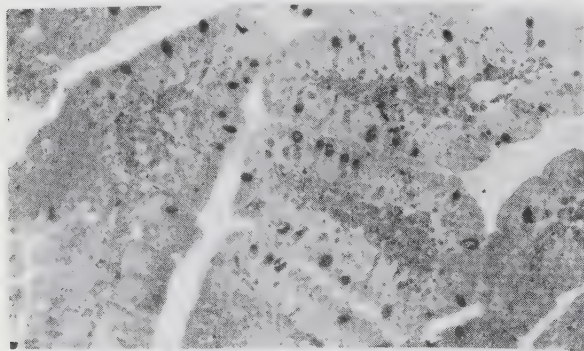


Abb. 9

Zotten eines Rattendarms.

Einbettung: Durcupan ACM, Schnittdicke 1 μ ,

Färbung: Abb. 7: KMnO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Movat

Abb. 8: Movat

Abb. 9: Giemsa

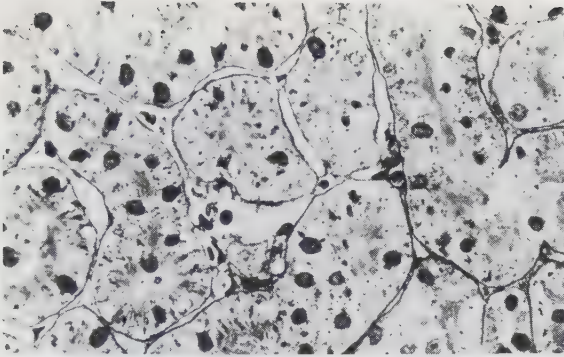


Abb. 10

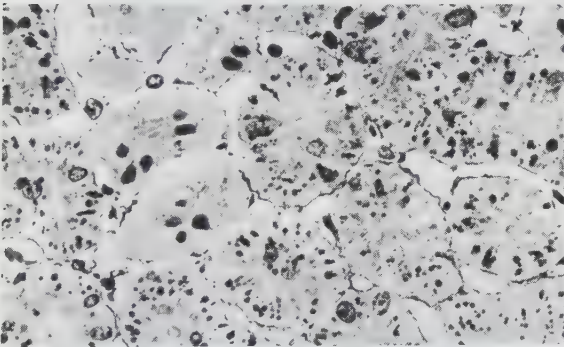


Abb. 11

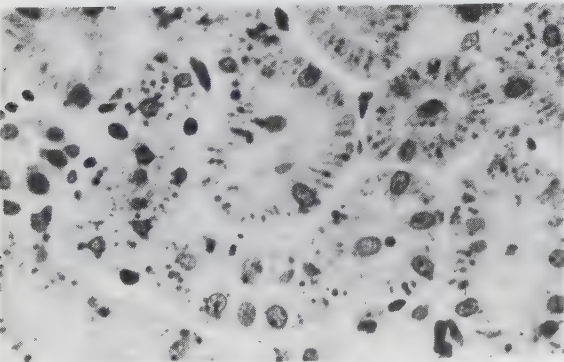


Abb. 12

Rattenniere.

Einbettung: Durcupan ACM, Schnittdicke $1\ \mu$,
Färbung: Abb. 10: KMnO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Movat

Abb. 11: Movat

Abb. 12: Giemsa

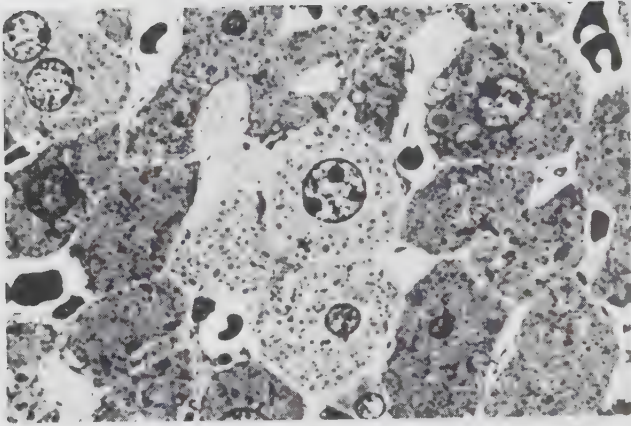


Abb. 13: Rattenleber.
Einbettung: Durcupan ACM, Schnittdicke 1 μ ,
Färbung: KMnO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Movat

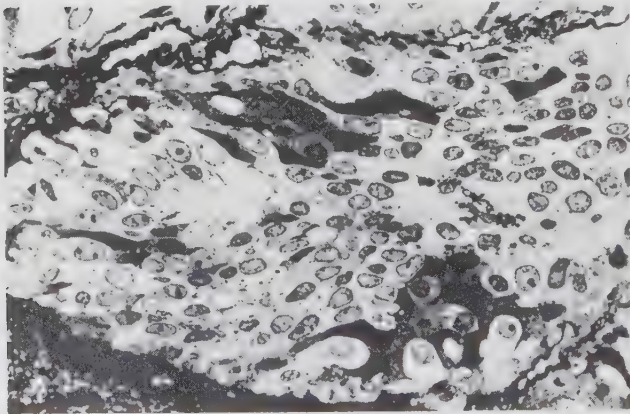


Abb. 14: Intraduktales Karzinom einer menschlichen
Brustdrüse.
Einbettung: Durcupan ACM, Schnittdicke 1 μ ,
Färbung: KMnO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Movat

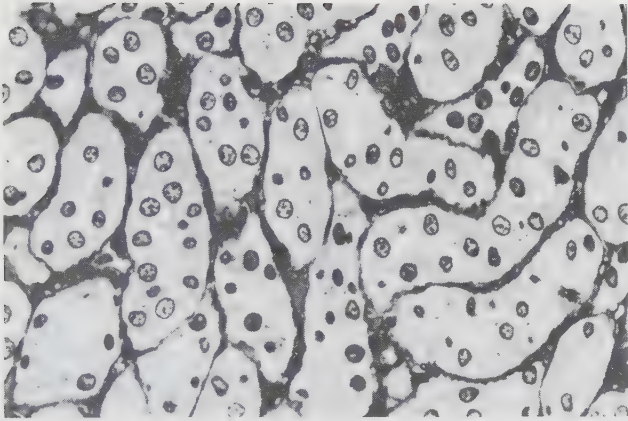


Abb. 15: Rattenniere.

Einbettung: Durcupan ACM, Schnittdicke 1 μ ,
Färbung: KMnO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Movat

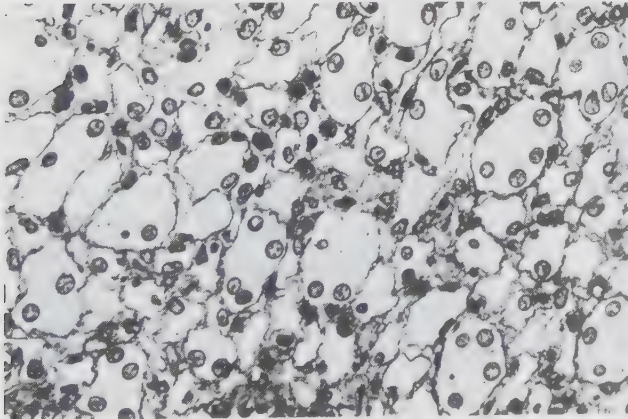


Abb. 16: Rattenniere.

Einbettung: Durcupan ACM, Schnittdicke 1 μ ,
Färbung: KMnO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Movat

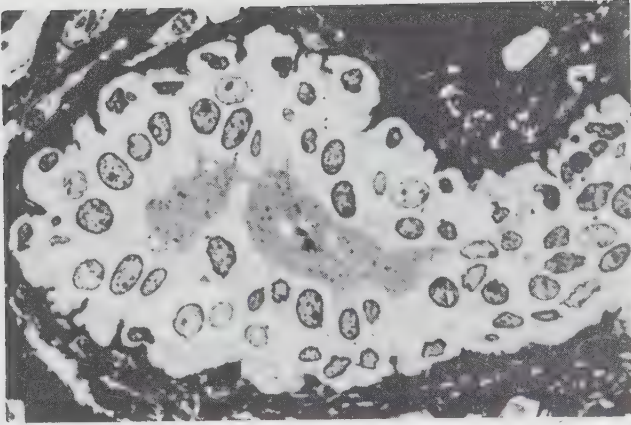


Abb. 17: Ausführungsgang einer menschlichen Brustdrüse.
Einbettung: Durcupan ACM, Schnittdicke 1 μ ,
Färbung: KMnO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Movat

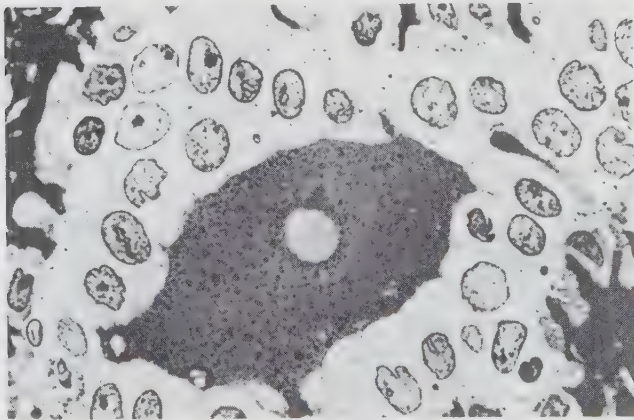


Abb. 18: Kleiner Drüsengang einer menschlichen Brustdrüse mit Sekret.
Einbettung: Durcupan ACM, Schnittdicke 1 μ ,
Färbung: KMnO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Movat

DISKUSSION

Das Grundanliegen unserer Untersuchungen war, die Methoden der Semidünnschnitttechnik, die sich auf viele Gebiete mehr und mehr ausdehnen, durch ein Färbeverfahren zu besseren Ergebnissen zu bringen. Wie wir feststellten, sind die Ergebnisse der Färbeverfahren stark abhängig von den Einbettungsmitteln, wie sie auch für die Routinehistologie der Elektronenmikroskopie Anwendung finden. Hier werden meist Kunstharze verwandt, die in der Regel schlechtere Färbeergebnisse zeigen als z.B. Methacrylat. Dabei stellen sich gewöhnlich die Basalmembran und retikulären Fasern gut dar, wesentlich schlechter der Kern und die zytoplasmatischen Mikrostrukturen. Aus diesem Grund strebten wir eine Verbesserung der Färbemethode am Semidünnschnitt an, da auch die allenthalben eingeführte NOVAT-Versilberung nicht zu ausreichenden Ergebnissen in diesem Sinne führt.

Unsere Bemühungen zielten darauf, eine Methode zu finden, durch die eine Färbung von Zellstrukturen erreicht wird, andererseits auf der Grundlage der NOVAT-Färbung deren Anfärbbarkeit der Basalmembranen erhalten bleibt. Nach verschiedenen Vorversuchen schalteten wir das aus der Elektronenmikroskopie bekannte KMnO_4 ein. Die Einführung des Kaliumpermanganates in den Färbevorgang bereitete anfänglich große Schwierigkeiten, da wir weder Anhalte für den Konzentrationsgrad, die Einwirkungszeiten und die Stelle, an der Kaliumpermanganat eingeschaltet werden muß, hatten.

Nach der KMnO_4 -Beizung richteten sich die weiteren Stufen des Färbevorgangs, so daß wir zu einer durch Erfahrung sich steigernden Standardisierung des Färbevorgangs kamen. Die KMnO_4 -

Beizung wird der Versilberung für 2 Stunden vorgeschaltet. Die KMnO_4 -Beizung könnte dadurch wirken, daß eine Oxydation erfolgt und an diesen "vorbereiteten" Stellen sich Silber zusätzlich niederschlagen kann, so z.B. auch innerhalb der Zelle an den zytoplasmatischen Strukturen wie Kernmembran, Membran des Nukleolus und den mitochondrialen Strukturen. Dadurch eignet sich diese Methode, zelluläre Einzelheiten zu erfassen. Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß es sich bei der beschriebenen Methode keineswegs um eine rasche Routineuntersuchung handelt, sondern daß bei dem Arbeitsgang nur dann gute Ergebnisse erwartet werden können, wenn sorgfältig präpariert und die von uns aufgestellten Kautelen des Färbeablaufs befolgt wurden. In stichwortartiger Übersicht ist die von uns aufgezeigte Modifizierung wie folgt anzuwenden:

1. 1 %iges Kaliumpermanganat für 120 min
2. Spülen in Aqua bidest.
3. 1 %iges Kaliummetabisulfit für 20 sec bis 2 min
4. Spülen in Aqua bidest.
5. 1 %ige Perjodsäure für 20 min
6. Spülen in Aqua bidest.
7. Silberlösung für 90 bis 120 min bei 60°C
8. Spülen in Aqua bidest.
9. 3 %iges Natriumthiosulfat für 5 min
10. Aufziehen der Schnitte auf Objektträger
11. 10 %iges wässriges Aceton für 5 min
12. 100 %iges Aceton 2-3 Tropfen
13. Xylol für mindestens 10 min
14. Eindecken in Eukitt.

Zeitdauer der Färbung: ca. 7 Std.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegenden Untersuchungen geben die bisher angewandten Färbeverfahren am Semidünnschnitt in einer Zusammenstellung wieder und vergleichen die Ergebnisse.

Durch eigene Untersuchungen am Semidünnschnitt mit verschiedenen Methoden wurde der Wert dieser Verfahren auf die Aussagekraft geprüft. Das bisher am erfolgreichsten angewandte Verfahren nach MOVAT führt zwar zu einer vorzüglichen Darstellung der Basalmembranen und der retikulären Fasern, wohingegen die zytoplasmatischen Strukturen nur unzulänglich angefärbt werden.

Wir modifizierten die MOVAT-Versilberung, um dadurch auch die intrazytoplasmatischen Organellen und Membranstrukturen zu erfassen.

Das Verfahren basiert auf einer KMnO_4 -Beizung, deren Wirkung darauf beruht, daß Organstrukturen oxydiert werden, an denen sich die Kontrast- bzw. Farbsubstanz niederschlagen kann.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALFIERI, A.: Un nuovo metodo per la depigmentazione dei tessuti.
Monit.Zool.ital. 8 (1897) S. 57

2. AOKI, A., L.S. GUTIERREZ: A simple toluidine blue-basic fuchsin stain for spermatozoa in epoxy sections.
Stain.Technol. 42 (1967) S. 307-310

3. APARICIO, S.R., P. MARSDEN: Application of standard microanatomical staining methods to epoxy resin-embedded sections.
J.clin.Path. 22 (1969) S. 589-592

4. BARER, R.: The complementary nature of light and electron microscopy.
J.roy.micr.Soc. 72 (1960) S. 181-207

5. BARTON, A.A.: The examination of ultrathin sections with light microscope after electron microscope.
Stain Technol. 34 (1959) S. 348-349

6. BEER, M.: Selective staining for electron microscopy.
Lab.Invest. 14 (1965) S. 1020-1025

7. BENCOSME, S.A., R.S. STONE et al.: A rapid method for localisation of tissue structures or lesions for electron microscopy.
J.biophys.biochem.Cytol. 5 (1959) S. 508-509

8. BENNET, H.S., J.H. LUFT: S-collidine as a basis for buffering fixatives.
J.biophys.biochem.Cytol. 6 (1959) S. 113-114

9. BERKOWITZ, L.R., O. FIORELLO et al.:
Selective staining of nervous tissue
for light microscopy following pre-
paration for the electron microscopy.
J.Histochem.Cytochem. 16 (1968)
S. 808-814
10. BRETSCHNEIDER, L.H.: A simple technique for the electron-
microscopy of cell and tissue sec-
tions.
Proc.Amst. 52 (1949) S. 654-666
11. BRYANT, V., J.H.L. WATSON:
A comparison of light microscopy
staining-methods applied to a poly-
ester and three epoxy resins.
Henry Ford Hosp.Bull. 15 (1967)
S. 65-74
12. BURCK, H.-C.: Histologische Technik.
Stuttgart (1966)
13. CARDNO, S.S., J.W. STEINER:
Improvement of staining technics
for thin sections of epoxy-embedded
tissue.
Amer.J.clin.Path. 43 (1965) S. 1-8
14. CHANDRA, S., F.R. SKELTON:
Staining juxtaglomerular cell gra-
nules with toluidine blue or with
basic fuchsin for light microscopy
after epon embedding.
Stain Technol. 39 (1964) S. 107-110
15. CHURG, J., W. MAUTNER et al.:
Silver impregnation for electron
microscopy.
J.biophys.biochem.Cytol. 4 (1958)
S. 841-842
16. DECK, D., G. SOUZA: A disrupting factor in silver staining
techniques.
Stain Technol. 34 (1959) S. 287

17. DODGE, J.D.: Cytochemical staining of sections from plastic-embedded flagellates. Stain Technol. 39 (1964) S. 381-386
18. DROPMANN, K.: Die Anwendung der Silberimprägnation von Nervenfasern in der Elektronenmikroskopie. Acta neuroveg. (Wien) 25 (1964) S. 418-426
19. ESTABLE-PUIG, J.F., W.C. BAUER et al.: Paraphenylenediamine staining of osmium-fixed plastic-embedded tissue for light and phase microscopy. J.Neuropath.exp.Neurol. 24 (1965) S. 531-535
20. FARQUHAR, M.G., J. HOPPER et al.: Diabetic glomerulosclerosis: electron and light microscopic studies. Amer.J.Path. 35 (1959) S. 721-753
21. FARRANT, J.L.: The ferritin crystal lattice in ultrathin sections. Int.Cong. El.Microsc. 3 (London 1954) S. 118-121
22. FERNANDEZ-MORAN, H.: A diamond knife for the ultrathin sectioning. Exp.Cell.Res. 5 (1953) S. 255-256
23. FERNANDEZ-MORAN, H., J.B. FINEAN: Electron microscope and low-angle x-ray diffraction studies of the nerve myelin sheath. J.biophys.biochem.Cytol. 3 (1957) S. 725-748
24. FREEMAN, J.A., B.D. SPURLOCK: A new embedment for electron microscopy. J.Cell.Biol. 13 (1962) S. 437-443
25. FINK, H.: Epox resins in electron microscopy. J.biophys.biochem.Cytol. 7 (1960) S. 27-30

26. GALL, G.: The nuclear envelope after KMnO₄-fixation.
J.biophys.biochem.Cytol. 6 (1959)
S. 115-117
27. GIBBONS, I.R.: A water-miscible embedding resin for electron microscopy.
Int.Cong. El Microsc 4,2 (Berlin 1958)
S. 55-58
28. GIBBONS, I.R.: In embedding resin miscible with water for electron microscopy.
Nature 184 (1959) S. 375-376
29. GILĚV, V.P.: The use of gelatin for embedding biological specimens in preparation of ultrathin sections for electron microscopy.
J.Ultrastruct.Res. 1 (1958) S.349-358
30. GLAUERT, A.M., G.E. ROGERS et al.: A new embedding medium for electron microscopy.
Nature 178 (1956) S. 803
31. GLAUERT, A.M., R.H. GLAUERT: Araldit as an embedding medium for electron microscopy.
J.biophys.biochem.Cytol. 4 (1958)
S. 191-194
32. GLAUERT, A.M.: A survey of embedding media for electron microscopy.
J.roy.micr.Soc. 80 (1962) S. 269-277
33. GÖMÖRI, G.: Silver impregnation of reticulum in paraffin sections.
Amer.J.Path. 13 (1937) S. 993-1001
34. GRAY, G.E.: Accurate localization in ultrathin sections by direct observation of the block face for trimming
Stain Technol. 36 (1961) S. 42-44

35. GRIMLEY, P.M.: A tribasic stain for thin sections of plastic-embedded OsO_4 -fixed tissues
Stain Technol. 39 (1964) S. 229-233
36. GRIMLEY, P.M.: Selection for electron microscopy of specific areas in large epoxy tissue sections.
Stain Technol. 40 (1965) S. 259-263
37. GRIMLEY, P.M., J.M. ALBRECHT et al.: Preparation of large epoxy sections for light microscopy as an adjunct to fine-structured studies.
Stain Technol. 40 (1965) S. 357-366
38. GRISHMAN, E., J. CHURG: Acute glomerulonephritis:
A histopathologic study by means of thin sections.
Amer.J.Path. 33 (1957) S. 993-1007
39. GURR, G.T.: Biological staining methods.
5. Aufl. London 1952
40. HANKER, J.S., Ch. DEB et al.: Staining tissue for light and electron microscopy by bridging metals with multidentate ligands.
Science 152 (1966) S. 1631-1634
41. HANSEN, F.C.C.: Hämatoxylin und Hämatoxylinfärbungen.
In: Enzyklopädie der Mikroskopischen Technik.
Hrsg.v. R. Krause Berlin/Wien 1926
3. Aufl. Bd. 2 S. 958-998
42. HAUG, H.: Leitfaden der Mikroskopischen Technik.
Stuttgart 1959
43. HILLIER, J.: On the sharpening of microtome knives for ultra - thin sectioning.
Rev.sci.Instr. 22 (1951) S. 185-188

44. HOLLÄNDER, H., J.L. VAALAND:
A reliable staining method for semi-thin sections in experimental neuroanatomy.
Braun Res. 10 (1968) S. 120-126
45. HOUCK, C.E., E.W. DEMPSEY:
Cytological staining procedures applicable to methacrylate-embedded tissues
Stain Technol. 29 (1954) S. 207-211
46. HUBER, D., F. PAKER et al.:
A basic fuchsin and alkalinized methylene blue rapid stain for epoxy-embedded tissue.
Stain Technol. 43 (1968) S. 83-87
47. ISHII, T., T. ISHII:
Zur Darstellung der argyrophilen Fasern.
Mikroskopie 20 (1965) S. 1-11
48. ITO, S., R.J. WINCHESTER:
The fine structure of the gastric mucosa in the bat
J.Cell Biol. 16 (1963) S. 541-577
49. JENNINGS, B.M., M.G. FARQUHAR et al.:
Staining methods for osmium-methacrylate sections.
Amer.J.Path. 35 (1959) S. 991-997
50. JEON, K.W.:
Simple method for staining and preserving epoxy resin-embedded animal tissue sections for light microscopy.
Life Sci. 4 (1965) S. 1839-1841
51. KELLENBERGER, E., W. SCHWAB et al.:
L'utilisation d'un copolymère du groupe des polyesters comme matériel d'inclusion en ultramicrotome.
Experienta (Basel) 12 (1956) S. 421-422
52. KRUTSAY, M.:
The preparation of iron-hematoxylin from alum-hematoxylin.
Stain Technol. 37 (1962) S. 249

53. KRUTSAY, M.: Permanganat-resorcin-fuchsin: A selective stain for elastic tissue.
Stain Technol. 37 (1962) S. 250-251
54. KUSHIDA, H.: A new polyester embedding method for ultrathin sectioning.
J.elect.microsc. 9, 2 (1960)
S. 113-116
55. KUSHIDA, H.: Further improved method for embedding with durcupan.
J.elect.microsc. 15 (1966) S. 94-95
56. LAFONTAINE J.G., C. ALLARD:
A light and electron microscope study of the morphological changes induced in rat liver cells by the azo dye 2-Me-DAB.
J.Cell Biol. 22 (1964) S. 143-172
57. LANE, B.P., L. EUROPA: Differential staining of ultrathin sections of epon-embedded tissues for light microscopy.
J.Histochem.Cytochem. 13 (1965)
S. 579-582
58. LASCANO, E.F.: Controlled differentiation of cells and connective tissue fibres in silver staining.
Stain Technol. 35 (1960) S. 23-29
59. LASCHI, R., M. BACCARANI:
Microscopia ottica di sezioni semi-fini ottenute da materiale preparato per la microscopia elettronica.
Arch.it.Anat.Embr. 72 (1967) S. 324-326
60. LATTA, H., J.E. HARTMANN:
Use of a glass edge in thin sectioning for electron microscopy.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 74 (1950)
S. 436-439

61. LAWN, A.M.: The use of potassium permanganat as an electron-dense stain for sections of tissue embedded in epoxy resin.
J.biophys.biochem.Cytol. 7 (1960)
S. 197
62. LEE, J.C., J. HOPPER: Basic Fuchsin-Crystal Violet: A rapid staining sequence for juxtaglomerular granular cells embedded in Epoxy resin
Stain Technol. 40 (1965) S. 37-39
63. LEESON, R.C., Th.S. LEESON: Staining methods for sections of epon-embedded tissues for light microscopy
Can.J.Zool. 48 (1970) S. 189-191
64. LUFT, J.H.: Permanganat: A new fixative for electron microscopy.
J.biophys.biochem.Cytol. 2 (1956)
S. 799-801
65. LUFT, J.H.: Improvements in epoxy resin embedding methods.
J.biophys.biochem.Cytol. 2 (1961)
S. 409-414
66. LYNN, J.A.: Rapid toluidine blue staining of epon-embedded and mounted "adjacent" sections.
Amer.J.clin.Path. 44 (1965) S. 57-58
67. LYNN, J.A., J.H. MARTIN et al.: Recent improvements of histologic technics for the combined light and electron microscopic examination of surgical specimens.
Amer.J.clin.Path. 45 (1966) S.704-713
68. MADEMANN, R., G. SIEPMANN et al.: Toluidinblau-Färbung von Epon-Dünnschnitten.
Mikroskopie 21 (1966) S. 29 - 31

69. MARINOZZI, V.: Techniques nouvelles de coloration
de tissus plastiques pour l'étude au
microscope optique à haute resolution.
Z.wiss.Mikr. 65 (1961-64) S. 219-230
70. MARINOZZI, V.: Cytochimie ultrastructural. Fixations
et colorations.
Experienta (Basel) 17(1961) S. 429
71. MARTINO de, C., P.G. NATALI et al.:
Influence of plastic embedding media
on staining and morphology of lipid
bodies.
Histochemie 16 (1968) S. 350-360
72. MATAKAS, F.: Färbemethoden und histochemische Re-
aktionen an Kunststoffdünnschnitten
für die lichtmikroskopischen Unter-
suchungen.
Mikroskopie 23 (1968) S. 337-344
73. MAYOR, H.D., J.C. HAMPTON et al.:
A simple method for removing the
resin from epoxy-embedded tissue.
J.biophys.biochem.Cytol. 2 (1961)
S. 909-910
74. Mc GEE RUSSEL: Diskussionsbeitrag zu Meercer, E.H.:
A scheme for section staining in
electron microscopy.
J.roy.micr.Soc. 81 (1963) S. 179-186
75. Mc LEAN, J.D., S.J. SINGER:
Cross-linked polyampholytes: New
water-soluble embedding media for
electron microscopy.
J.Cell Biol. 20 (1964) S. 518-521
76. MILLONG, G.: Further observations on a phosphate
buffer for osmium solution in fixa-
tion.
Int.Cong.El.Microsc. 5,2 (Philadelphia
1962) S. 8

77. MOE, H., O. BEHNKE et al.:
Staining of osmium fixed vestopal
embedded tissue sections for light
microscopy.
Acta anat. (Basel) 48 (1962) S. 142-148
78. MOE, H.:
Removal of a cobald sulfide stain
from thick sections and subsequent
staining with specific stains for
identification of structures found
by electron microscopy of adjacent
thin sections.
Acta anat. (Basel) 49 (1962) S.189-198
79. MOORE, R.D., V. MUMAW et al.:
Optical microscopy of ultrathin tissue
sections.
J.Ultrastruct.Res. 4 (1960) S. 113-116
80. MOVAT, Z.H.:
Silver impregnation methods for elec-
tron microscopy.
Amer.J.clin.Path. 35 (1961) S. 528-537
81. MUNGER, B.L.:
Of osmium fixed tissue for light
microscopy.
J.biophys.biochem.Cytol. 11 (1961)
S. 502-506
82. NEWMAN, S.B., E. BORYSKO et al.:
New sectioning techniques for light
and electron microscopy.
Science 110 (1949) S. 66-68
83. NEWMAN, S.B., E. BORYSKO et al.:
Ultra-microtomy by a new method.
J.Res.natn.Bur.Stand. 43 (1949)
S. 183-199
84. NILSSON, O., C. WIRSEN:
Pas-staining of osmium-fixed freeze-
substituted mouse uterine epithelium.
Acta morph.neerl.-scand. 3 (1959)
S. 123-130
85. PAL, J.:
Ein Beitrag zur Nervenfärbetechnik.
Med.Jahrb. Wien 1886 S. 619-631

86. PALADE, G.E.: A study of fixation for electron microscopy.
J.exp.Med. 95 (1952) S. 285-298
87. PALADE, G.E.: The fixation of tissues for electron microscopy.
Int.Cong.El.Microsc. 2 (London 1954)
S. 129-142
88. PARADISI, F.: Utilizzazione di ultrasezione di pancreas sottoposte alla impregnazione argantica per l'esame al microscopio ottico.
Boll.Soc.ital.Biol.sper. 41 (1965)
S. 96-97
89. PEASE. D.C., R.F. BAKER et al.: Sectioning techniques for electron microscopy using a conventional microtome.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 67 (1948)
S. 470-474
90. PEASE D.C.: Buffered formaldehyde as a killing agent and primary fixative for electron microscopy.
Anat.Rec. 142 (1962) S. 342
91. PENTTILÄ, A.: Identification of enterochromaffin cells in adjacent epon-embedded sections at light and electron microscopic levels.
Z.Zellforsch. 102 (1969) S. 193-204
92. PERDRAU, J.R.: The silver reduction method for the demonstration of connective-tissue fibres.
J.Path.Bact. 24 (1921) S. 117
93. PETERS, H.: Storing electron microscope grids for correlations by light and by electron microscopy.
Stain Technol. 37 (1962) S. 115

94. POOL, Ch.R.: Hematoxylin-eosin staining of OsO_4 -fixed epon-embedded tissue: Prestaining oxidation by acidified H_2O_2 .
Stain Technol. 44 (1969) S. 75-79
95. REIMER, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden.
2. Aufl. Heidelberg 1967
96. RHODIN, J.: Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney.
Stockholm 1954
97. RICHARDSON, K.C., O. JARETT et al.: Embedding in epoxy resins for ultrathin electron microscopy.
Stain Technol. 35' (1960) S. 313-323
98. RIEDEL, B.: Eine schnelle Methode zur Darstellung des juxtaglomerulären Apparates in sogenannten dicken Schnitten Vestopal W-, Araldit- und Epon-eingebetteten Materials.
Z.mikr.-anat.Forsch. 74 (1966)
S. 209-214
99. ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik.
15. Aufl. München 1948
100. ROSEN, S., C.L. PIRANI et al.: Renal-interstitial foam cells.
Amer.J.clin.Path. 45 (1966) S. 32-41
101. ROSEN, W.C., C.R. BASOM et al.: A technique for the light microscopic of tissues fixed for fine structure.
Anat.Rec. 158 (1967) S. 223-237
102. ROSENBERG, M., P. BARTL et al.: Water soluble methacrylate as an embedding medium for the preparation of ultrathin sections.
J.Ultrastruct.Res. 4 (1960) S.298-303

103. ROTH, S.L., B.L. MUNGER:
The cytology of the adenomatous atrophic and hyperplastic parathyroid glands of man.
Virchows Arch.path.Anat. 335 (1962) S. 389-410
104. ROULET, F.:
Methoden der Pathologischen Histologie
Wien 1948
105. RÜDEBERG, C.:
A rapid method for staining thin sections of Vestopal W-embedded tissue for light microscopy.
Experienta (Basel) 23 (1967) S. 792
106. RUNGE, J., R.L. VERNIER et al.:
A staining method for sectiones of osmium-fixed methacrylate embedded tissue.
J.biophys.biochem.Cytol. 4 (1958) S. 327
107. RUTHMANN, A.:
Methoden der Zellforschung.
1. Aufl. Stuttgart 1966
108. RYTER, A., E. KELLENBERGER:
L'inclusion au polyester pour l'ultramicrotomie.
J.Ultrastruct.Res. 2 (1958) S. 200-214
109. SCHANTZ, A., A. SCHECHTER:
Iron-hematoxylin and safranin O as a polychrome stain for epon sections.
Stain Technol. 40 (1965) S. 279-282
110. SCHWALBACH, G., K.-G. LICKFELD et al.:
Differentiated staining of osmium tetroxide-fixed vestopal-w-embedded tissue in thin sectiones.
Stain Technol. 38 (1963) S. 15-21
111. SHIRES, T.K., M. JOHNSON et al.:
Hematoxylin staining of tissues embedded in epoxy resins.
Stain Technol. 44 (1969) S. 21-25

112. SPURLOCK, B.O., V.C. KATTINE et al.:
Technical modification in maraglass embedding.
J.Cell Biol. 17 (1963) S. 203-207
113. SPURLOCK, B.O., M.S. SKINNER et al.:
A simple rapid method for staining epoxy-embedded specimens for light microscopy with the polychromatic stain paragon-1301.
Amer.J.clin.Path. 46 (1966) S. 252-258
114. STÄUBLI, W.:
Nouvelle matiere d'inclusion hydro-soluble pour la cytologie electron.
C.R.Acad.Sci. (Paris) 250 (1960)
S. 1137-1139
115. STUART, W., M.D. SMITH:
Reticular and areticular nissle bodies in sympathetic neurons of a lizard.
J.biophys.biochem.Cytol. 6 (1959)
S. 77-84
116. SUSUKI, T., S. SEKIYAMA:
Application of methenamine silver stain for electron microscopy.
J.elect.microsc. 10 (1961) S. 36-38
117. TANAKA, Y., J.A. BERSCHAUER:
Application of the Perls method for iron staining to sections embedded in epoxy resin.
Stain Technol. 44 (1969) S. 255-256
118. THOENES, W.:
Giemsa-Färbung an Geweben nach Einbettung in Polyester ("Vestopal") und Methacrylat.
Z.wiss.Mikr. 64 (1960) S. 406-413
119. THOENES, W., P. BANNASCH:
Elektronen- und lichtmikroskopische Untersuchungen am Cytoplasma der Leberzellen nach akuter und chronischer Thioacetamid-Vergiftung.
Virchows Arch.path.Anat. 335 (1962)
S. 557-583

120. TOWNSEND, F.G.: Demonstrating the nuclear membran of the macro yeast cell with KMnO_4 staining.
Stain Technol. 36 (1961) S. 40-41
121. TRUMP, B.F., E.A. SMUCKLER et al.: A method for staining epoxy sections for light microscopy.
J.Ultrastruct.Res. 5 (1961) S. 343-348
122. TRUMP, B.F., J.L.E. ERICSSON: The effect of fixative solution on the ultrastructure of cells and tissue.
Lab.Invest. 14 (1965) S. 1245-1323
123. TZITSIKAS, H., E.L. RDZOK et al.: Staining procedures for ultrathin sections of tissues embedded in polyester resin.
Stain Technol. 36 (1961) S. 355-359
124. TZITSIKAS, H., E.J. RDZOK et al.: Silver staining of ultrathin sectiones of tissue embedded in polyester resin.
Stain Technol. 37 (1962) S. 293-298
125. TZITSIKAS, H., E.J. RDZOK et al.: Staining residual lipids in ultrathin sections of tissues embedded in polyester resin.
Stain Technol. 37 (1962) s. 299-301
126. WELSH, R.A.: Light and electron microscopic correlation of the periodic-acid-shiff reaction in the human plasma cell.
Amer.J.Path. 40 (1962) S. 285-296
127. WINKELSTEIN, J., M.G. MENEFEE et al.: Basic fuchsin as a stain for osmium-fixed epon embedded tissue.
Stain Technol. 38 (1963) S. 202-204
128. WISCHNITZER, S.: Application of electron microscopy preparation methods to histological light microscopy.
Z.wiss.Mikr. 65 (1963) S. 325-329

129. WOOD, R.L.: An electron microscope study of developing bile canaliculi in the rat.
Anat.Rec. 151 (1965) S. 507 - 529
130. WOOD, R.L., J.H. LUTT: The influence of buffer systems on fixation with osmium tetroxyd.
J.Ultrastruct.Res. 12 (1965) S. 22-45
131. ZETTERQVIST, H.: The ultrastructural organisation of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. An electron microscopic studie including some experiments regarding the problem of fixation and an investigation of vitamin A deficiency.
Stockholm 1956

Herrn Professor Dr. Bässler möchte ich für die Überlassung des Themas und die wertvolle Anregung und unterstützende Leitung der Arbeit meinen besonderen Dank sagen.

Fräulein Walter danke ich für das sorgfältige Arbeiten beim Einbetten der Gewebe.

LEBENS LAUF

Am 24. Mai 1944 wurde ich als erstes Kind des kaufm. Angestellten Hans Völkers und seiner Ehefrau Charlotte, geborene Kresser, in Naumburg/Saale geboren. In Wiesbaden, Mannheim und Mainz-Kastel besuchte ich von 1951 - 1954 die Grundschule, anschließend das Elly Heuss-Gymnasium in Wiesbaden und bestand dort 1964 das Abitur. Im selben Jahr immatrikulierte ich mich an der Medizinischen Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, wo ich 1968 die Ärztliche Vorprüfung ablegte. Im Juli 1971 bestand ich das medizinische Staatsexamen.



